

24.11.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6913

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年10月 4日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第282716号

出 願 人

Applicant (s):

味の素株式会社

REC'D 08 DEC 2000

4

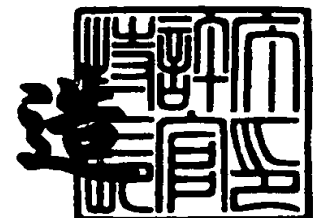
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3093601

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6559

【提出日】 平成11年10月 4日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 高温耐性コリネ型細菌の耐熱性グルタミン酸生合成系酵素遺伝子

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

【氏名】 松崎 友美

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

【氏名】 中村 佳苗

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

【氏名】 木村 英一郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

【氏名】 中松 亘

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵技術研究所内

【氏名】 松井 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

【氏名】 大住 剛

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵  
技術研究所内

【氏名】 倉橋 修

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 1 1 - 2 8 2 7 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高温耐性コリネ型細菌の耐熱性グルタミン酸生合成系酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 2 記載の DNA。

(a) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 3 に記載の塩基配列又は同塩基配列から調製されるプライマーとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質。

(C) 配列表の配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のクエン酸シンターゼ。

(D) 配列表の配列番号 10 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上のクエン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 5】 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする DNA

(C) 配列表の配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のクエン酸シンターゼ。

(D) 配列表の配列番号 14 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上のクエン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 6】 下記 (c) 又は (d) に示す DNA である請求項 2 記載の DNA。

(c) 配列表の配列番号 13 に記載の塩基配列からなる塩基配列を含む DNA。

(d) 配列表の配列番号 13 に記載の塩基配列又は同塩基配列から調製されるプライマーとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上のクエン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高温耐性コリネ型細菌であるコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスの耐熱性酵素遺伝子、特に L-グルタミン酸生合成系酵素遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、L-グルタミン酸等の L-アミノ酸の製造は、コリネ型細菌による発酵生産が主流となっている。アミノ酸の発酵生産は、生産能に優れた菌株の育種や発酵技術の開発によって、コストダウンが図られている。従来、コストダウン実

現の方向性は、高収率化が主なものであるが、発酵におけるコストとしては、原料以外にも培養中に発生する発酵熱の冷却エネルギーを無視することはできない。すなわち、発酵に用いられている通常の微生物は、発酵中に自らが発生する発酵熱により培地の温度が上昇し、発酵に必要な酵素が失活したり生産菌が死滅したりするために、発酵中に培地を冷却することが必要となっている。したがって、冷却費用を低減するために、高温での発酵に関する検討が古くから行われている。また、高温で発酵を行うことが可能となれば、反応速度を向上させることができる可能性もある。しかし、これまでのところ、L-アミノ酸発酵において、有効な高温培養は実現していない。

## 【0003】

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス (*Corynebacterium thermoaminogenes*) は、L-アミノ酸の発酵に汎用されているコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)) 等と同様にコリネ型細菌に分類される細菌であるが、生育至適温度はコリネバクテリウム・グルタミカムの30~37℃に対して37~40℃と高く、L-グルタミン酸生成の至適温度も42~45℃とかなり高温側にシフトしている (特開昭63-240779号)。

## 【0004】

ところで、コリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属細菌において、エシェリヒア・コリ又はコリネバクテリウム・グルタミカム由来のクエン酸シンターゼをコードする遺伝子の導入が、L-グルタミン酸生産能の増強に効果的であったことが報告されている (特公平7-121228号)。また、特開昭61-268185号公報には、コリネバクテリウム属細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有した細胞が開示されている。さらに、特開昭63-214189号公報には、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、アコニット酸ヒドラターゼ遺伝子、及びクエン酸シンターゼ遺伝子を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる技術が開示されている。

## 【0005】

しかし、高温耐性のコリネ型細菌由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、及びそれらをコードする遺伝子は報告されていない。

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コリネバクテリウム・グルタミカムよりも高い温度で機能するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来の酵素及びそれらをコードする遺伝子を提供することを課題とする。

【0 0 0 7】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「GDH」ともいう）及びクエン酸シンターゼ（以下、「CS」ともいう）が、コリネバクテリウム・グルタミカムのこれらの酵素よりも至適反応温度及び耐熱性が顕著に高いことを見出し、さらにこれらの酵素をコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0 0 0 8】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

(2) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ。

(B) 配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、か



つ、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

(3) 下記 (a) 又は (b) に示すDNAである (2) 記載のDNA。

(a) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号3に記載の塩基配列又は同塩基配列から調製されるプライマーとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

(4) 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質。

(C) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のクエン酸シンターゼ。

(D) 配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上のクエン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

(5) 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列表の配列番号14に記載のアミノ酸配列を有するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のクエン酸シンターゼ。

(D) 配列表の配列番号14に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上のクエン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

(6) 下記 (c) 又は (d) に示すDNAである (2) 記載のDNA。

(c) 配列表の配列番号13に記載の塩基配列からなる塩基配列を含むDNA

(d) 配列表の配列番号13に記載の塩基配列又は同塩基配列から調製されるプライマーとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上のクエン酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

【 0 0 0 9 】

本発明において、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性とは、2-オキシグルタル酸からL-グルタミン酸を生成する反応を触媒する活性をいう。また、クエン酸シンターゼ活性とは、オキサロ酢酸及びアセチルCo-Aからクエン酸を生成する反応を触媒する活性をいう。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の第一のタンパク質は、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「GDH」ともいう）である。ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマメンタムのGDHが37℃付近で最もGDHの比活性が高く、42℃付近で活性は著しく低下するのに対し、本発明のGDHは、42℃で37℃における活性と同等又はそれ以上のGDH活性を示す。好ましい実施態様では、本発明のGDHは、42℃付近で最も比活性が高く、45℃でも活性を示す。

GDH活性は、例えば、100mM Tris-HCl (pH8.0)、20mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸ナトリウム、0.25mM NADPHに酵素を加え、340nmにおける吸光度の変化を測定することによって、測定することができる (Molecular Microbiology (1992) 6, 317-326)。

【 0 0 1 1 】

本発明の第二のタンパク質は、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来のクエン酸シンターゼ（以下、「CS」ともいう）である。ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマメンタムのCSが23℃付近で最もCSの比活性が高く、33℃付近で活性が著しく低下するのに対し、本発明のCSは、37℃で23℃における活性と同等又はそれ以上の活性を示す。好ましい実施態様では、本発明のCSは、37℃付近までは反応温度に依存して高い比活性を示し、40℃でも37℃における活性の約4割の活性を示す。

CS活性は、例えば、Methods in Enzymol., 13, 3-11 (1969)に記載の方法によって測定することができる。

【 0 0 1 2 】

本発明のGDHは、42℃で37℃におけるGDH活性と同等又はそれ以上の活性を有する限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含んでいてもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えない場合があることに由来する。従って、GDHを構成するアミノ酸配列全体に対し、40～80%以上、好ましくは80～90%以上の相同性を有し、42℃で37℃におけるGDH活性と同等又はそれ以上の活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「数個」は、2から300個、好ましくは、2から50個、より好ましくは2から10個である。

## 【0013】

また、本発明のCSは、37℃で23℃におけるCS活性と同等又はそれ以上の活性を有する限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含んでいてもよい。「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、CSを構成するアミノ酸配列全体に対し、40～80%以上、好ましくは80～90%以上の相同性を有し、37℃で23℃におけるCS活性と同等又はそれ以上の活性を有するものは、本発明のCSに含まれる。具体的には、前記「数個」は、2から300個、好ましくは、2から50個、より好ましくは2から10個である。

## 【0014】

本発明のGDH及びCSは、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス、例えばコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株の菌体破碎液から、GDH活性又はCS活性を指標として、通常の酵素の精製法、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、塩析、溶媒沈殿等の方法で精製することによって、取得することができる。また、以下に述べるGDHをコードするDNA又はCSをコードするDNAを、適当な宿主で発現させることによって、製造することができる。

## 【0015】

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株は、通商産業省工業技術

院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）にブタペスト条約に基づいて寄託され、受託番号FERM BP-1542が付与されている。

本発明の第一のDNAは、上記本発明のGDHをコードするDNA（以下、「gdh」ともいう）である。第一のDNAには、GDHと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAも含まれる。また、本発明の第二のDNAは、上記本発明のCSをコードするDNA（以下、「gltA」ともいう）である。第二のDNAには、CSと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAも含まれる。

【0016】

本発明の第一のDNAは、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス、例えばコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株の染色体DNAから、該染色体DNAを鋳型とし、配列表の配列番号1及び2に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）により部分断片を取得することができる。さらに、得られた部分断片を用いてゲノムウォーキングを行うことにより、gdh遺伝子全体を取得することができる。

【0017】

同様に、本発明の第二のDNAは、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス、例えばコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株の染色体DNAから、該染色体DNAを鋳型とし、配列表の配列番号7及び8に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）により部分断片を取得することができる。さらに、得られた部分断片を用いてゲノムウォーキングを行うことにより、gltA遺伝子全体を取得することができる。

【0018】

上記プライマーの塩基配列は、すでに報告されている種々の微生物のgdh遺伝子の塩基配列の比較を行い、塩基配列がよく保存されている領域を見出し、その領域の塩基配列に基づいて設計したものである。

【0019】

本発明のDNAは、上記のようにして取得されたものであるが、本発明のDNAの塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリ

ダイゼーションによって、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスの染色体 DNA ライブラリーから取得することもできる。

【 0 0 2 0 】

染色体 DNA の調製、染色体 DNA ライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミド DNA の調製、DNA の切断及び連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989) に記載されている。また、ゲノムウォーキングは、市販のキット、例えば TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造 (株) 製) を用いて行うことができる。

【 0 0 2 1 】

上記のようにして得られた *gdh* 遺伝子の塩基配列を、配列番号 3 に示す。また、同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。また、同様にして得られた *gltA* 遺伝子の塩基配列を、配列番号 1 3 に示す。また、同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号 1 4 に示す。

【 0 0 2 2 】

本発明の第一の DNA は、コードされる GDH が、42℃ で 37℃ における GDH 活性と同等又はそれ以上の活性を有する限り、1 若しくは複数の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む GDH をコードするものであってもよい。また、本発明の第一の DNA は、コードされる CS が、37℃ で 23℃ における CS 活性と同等又はそれ以上の活性を有する限り、1 若しくは複数の位置での 1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む CS をコードするものであってもよい。尚、「数個」の意味については、前記と同様である。

【 0 0 2 3 】

上記のような GDH 又は CS と実質的に同一のタンパク質をコードする DNA は、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように *gdh* 遺伝子又は *gltA* 遺伝子の塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変された DNA は、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、GDH 又は CS をコー

ドするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びGDH又はCSをコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0024】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、GDH又はCSを保持する微生物の個体差、種の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

【0025】

GDHをコードする変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のGDH活性を調べることにより、GDHと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するGDHをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号3に記載の塩基配列を有するDNA又は同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、42℃でGDH活性を示すタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、GDHと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0026】

また、CSをコードする変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のCS活性を調べることにより、CSと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するCSをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号13に記載の塩基配列を有するDNA又は同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、37℃でCS活性を示すタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、CSと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0027】

上記プローブは、配列番号3に記載の塩基配列を有するDNA、又は配列番号13に記載の塩基配列を有するDNAから、適当なプライマーを用いてPCRにより調製することができる。

【0028】

上記でいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイ

【0029】

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎGDH活性又はCS活性を前記の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

【0030】

本発明のGDH又はCSをコードするDNAを、適当な宿主-ベクター系を用いて発現させることにより、GDH又はCSを製造することができる。

gdh遺伝子又はgltA遺伝子を発現させるための宿主としては、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ、バチルス・ズブチリスをはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）をはじめとする種々の真核細胞、動物細胞、植物細胞が挙げられるが、これらの中では原核細胞、特にコリネ型細菌及びエシェリヒア・コリが好ましい。

【0031】

gdh遺伝子又はgltA遺伝子は、エシェリヒア・コリ及び／又はコリネ型細菌等の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリ細胞に導入しておくこと、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラス

ミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pAM330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM1519（特開昭58-77895号公報参照）等が挙げられる。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【 0 0 3 3 】

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をカッコ内に示した。

pAJ655 エシェリヒア・コリAJ11882(FERM BP-136)  
 コリネバクテリウム・グェルタミクスSR8201(ATCC39135)  
 pAJ1844 エシェリヒア・コリAJ11883(FERM BP-137)  
 コリネバクテリウム・グェルタミクスSR8202(ATCC39136)  
 pAJ611 エシェリヒア・コリAJ11884(FERM BP-138)  
 pAJ3148 コリネバクテリウム・グェルタミクスSR8203(ATCC39137)  
 pAJ440 ハンチルス・スプツチスAJ11901(FERM BP-140)  
 pHc4 エシェリヒア・コリAJ12617(FERM BP-3532)

【 0 0 3 4 】

gdh遺伝子又はglta遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、gdh遺伝子又はglta遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

【 0 0 3 5 】

上記のように調製した組み換えDNAをコリネ型細菌等の宿主に導入するには



、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理して DNA の透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製して DNA を導入する方法 (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA 受容菌の細胞を、組換え DNA を容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換え DNA を DNA 受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)) も応用できる。コリネ型細菌においては、電気パルス法 (特開平 2-207791 号公報参照) が有効である。

## 【0036】

gdh 遺伝子又は gltA 遺伝子の発現を効率的に実施するために、これらの遺伝子のコード領域の上流に、宿主細胞内で働く lac、trp、P<sub>L</sub> 等のプロモーターを連結してもよい。ベクターとして、プロモーターを含むベクターを用いると、gdh 遺伝子又は gltA 遺伝子と、ベクター及びプロモーターとの連結を一度に行うことができる。

## 【0037】

上記のようにして製造される GDH 又は CS は、必要に応じて、菌体抽出液又は培地からイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、塩析、溶媒沈殿等、通常の酵素の精製法を用いて精製することができる。

## 【0038】

gdh 遺伝子又は gltA 遺伝子を、コリネ型細菌等の L-グルタミン酸生産菌に導入することによって、通常よりも高い温度での L-グルタミン酸の生産が可能となることが期待される。また、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムの CS

は、通常の培養温度、例えば31.5℃では十分に機能していない可能性があるが、本発明のglutA遺伝子を導入することによって、活性を高めることができる。

【0039】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0040】

【実施例1】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスのGDH活性の検討

CM-2B寒天培地（イーストエキストラクト（Difco社製）1g/dl、ポリペプトン（日本製薬製）1g/dl、NaCl 0.5g/dl、ビオチン 10  $\mu$ g/dl、寒天 1.5g/dl、pH 7.0（KOHで調整））で生育させたコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス野生株であるAJ12310株の菌体を、下記組成のフラスコ用培地を20ml入れた500ml容フラスコに接種し、37℃で17時間（残糖が1g/dl程度になるまで）培養した。

【0041】

同様に、CM-2B寒天培地で生育させたブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム2256株（ATCC13869）の菌体を31.5℃で17時間培養した。

【0042】

〔フラスコ用培地〕

グルコース	3	g/dl
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1	g/dl
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04	g/dl
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	mg/dl
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	mg/dl
ビタミンB1-HCl	200	$\mu$ g/L
ビオチン	50	$\mu$ g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.5	g/dl
大豆蛋白加水分解液	48	mg/dl
(Memeno(T-N))		
$\text{CaCO}_3$ （局方）	5	g/dl（別殺菌）
pH 8.0（KOHで調整）		

## 【0043】

上記培養液約 1 ml を 1000rpm で 1 分遠心して  $\text{CaCO}_3$  を除去した後、菌体を 200mM K-リン酸緩衝液 (pH6.9) で 2 回洗浄し、同緩衝液 300  $\mu$ l に懸濁させた。得られた菌体懸濁液を 5 分間超音波処理して菌体を破碎した後、1000rpm で 30 分遠心し、上清を粗酵素液として得た。

## 【0044】

上記粗酵素液を用いて GDH 活性の至適反応温度及び熱安定性を調べた。GDH 活性の測定は、反応液 (100mM Tris-HCl (pH8.0)、20mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸ナトリウム、0.25mM NADPH) に粗酵素液を加え、340nm における吸光度の変化を測定することによって行った。また、粗酵素液のタンパク質濃度を、Bradford 法 (Bio-Rad Protein Assay Kit を使用) により、ウシ血清アルブミンを標準として、595nm での吸光度を測定することによって定量した。吸光度の測定は、HITACHI U-2000 (日立製作所製) を用いて行った。

## 【0045】

種々の反応温度で測定した GDH 活性を、図 1 に示す。ATCC13869 株では、37℃ 付近で最も GDH の比活性が高く、42℃ 付近で活性が著しく低下するのに対し、AJ12310 株では 42℃ 付近で最も比活性が高く、45℃ でも活性を示した。

## 【0046】

次に、GDH の熱安定性を調べた。反応前に、粗酵素液を 0～30 分間 65℃ においた後、30℃ における酵素活性を測定した。その結果を図 2 に示す。この結果から明らかなように、ATCC13869 株の GDH は 5 分間の熱処理で失活したのに対し、AJ12310 株の GDH は 30 分間の熱処理でも活性が維持された。尚、AJ12310 株の粗酵素液は、少なくとも 65℃、90 分の熱処理後にも GDH 活性にほとんど変化が認められなかった (データは示さない)。

## 【0047】

### 【実施例 2】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスの CS 活性の検討

実施例 1 と同様に コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12310 株の菌体及びブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC13869 株から調製した粗酵素液を用いて、CS の反応至適温度及び熱安定性を調べた。CS 活性の測定は、反応

液 (100mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)), 200mM L-グルタミン酸ナトリウム、0.3mM アセチルCo-A) に粗酵素液を加え、412nmにおける吸光度の変化を測定することによって行った。

## 【0048】

種々の反応温度で測定したCS活性を、図3に示す。ATCC13869株では23℃付近で最もCSの比活性が高く、33℃付近で活性が著しく低下するのに対し、AJ12310株では37℃付近までは反応温度に依存して高い比活性を示し、40℃でも37℃における活性の約4割の活性を示した。

## 【0049】

次に、CSの熱安定性を調べた。反応前に、粗酵素液を33～55℃で5分間おいた後、30℃における酵素活性を測定した。その結果を図4に示す。ATCC13869株のCSは35～40℃の熱処理で失活したのに対し、AJ12310株のCSは50℃の熱処理でも約4割の活性が維持された。

## 【0050】

【実施例3】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスのgdh遺伝子の取得  
すでに報告されている種々の微生物のgdh遺伝子の塩基配列の比較を行った。  
そして、塩基配列がよく保存されている領域を見出し、その領域の塩基配列の基  
づいて配列番号1及び2に示す塩基配列を有するプライマーを作製した。

## 【0051】

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株からBacterial Genome DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies社製)を用いて調製した染色体DNAを鋳型とし、前記プライマーを用いてPCRを行った。得られたDNA断片をもとに、TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造(株)製)を用いてゲノムウォーキングを行い、gdh遺伝子全体を取得し、全塩基配列を決定した。結果を配列番号3に示す。また、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号4に示す。

## 【0052】

同様にして、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株のgdh遺伝子を取得し、塩基配列を決定した。結果を配列番号5に示す。また同塩基配列

によってコードされるアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

【0053】

上記のようにして決定されたコリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株とブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムATCC 13869株のgdh遺伝子の塩基配列及びGDHのアミノ酸配列と、公知のコリネバクテリウム・グルタミカム (C. glutamicum) ATCC13032株のgdh遺伝子及びGDHのアミノ酸配列 (Molecular Microbiology (1992) 6, 317-326) との相同性を調べた。結果を表 1 (塩基配列) 及び表 2 (アミノ酸配列) に示す。

【0054】

【表 1】

表 1 各種gdh遺伝子の塩基配列の相同性

	ATCC13869	ATCC13032	AJ12310
ATCC13869	—	94.5%	82.4%
ATCC13032	—	—	78.1%
AJ12310	—	—	—

【0055】

【表 2】

表 2 各種GDHのアミノ酸配列の相同性

	ATCC13869	ATCC13032	AJ12310
ATCC13869	—	90.8%	91.7%
ATCC13032	—	—	83.4%
AJ12310	—	—	—

【0056】

【実施例 4】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスの *gltA* 遺伝子の取得  
すでに報告されている種々の微生物の *gltA* 遺伝子の塩基配列の比較を行った。  
そして、塩基配列がよく保存されている領域を見出し、その領域の塩基配列の基  
づいて配列番号 7 及び 8 に示す塩基配列を有するプライマーを作製した。

## 【0057】

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12310 株 (FERM BP-1542) から Bac  
terial Genome DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies 社製) を  
用いて調製した染色体 DNA を鋳型とし、前記プライマー 7、8 を用いて PCR を行い  
、増幅した約 0.9kb の塩基配列を決定した。

得られたコリネバクテリウム・グルタミカムの *gltA* 遺伝子の塩基配列 (Microb  
iol., 140, 1817-1828 (1994)) をもとに、配列番号 9、10、11、及び 12  
のプライマーを作成し、上記と同様に AJ12310 の染色体 DNA を鋳型にし、配列  
番号 9、10、11、及び 12 のプライマーを用いて PCR を行い、増幅した DN  
A 断片の塩基配列を決定し、*gltA* 遺伝子全体の全塩基配列を決定した。結果を配  
列番号 13 に示す。また、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号  
14 に示す。

## 【0058】

同様にして、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム 2256 株の *gltA* 遺伝子  
を取得し、塩基配列を決定した。結果を配列番号 15 に示す。また同塩基配列に  
よってコードされるアミノ酸配列を配列番号 16 に示す。

## 【0059】

上記のようにして決定されたコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ1231  
0 株とブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13032 株の *gltA* 遺伝子の塩  
基配列及び CS のアミノ酸配列と、公知のコリネバクテリウム・グルタミカム (Mi  
crobiol., 140, 1817-1828 (1994)) ATCC13032 株の *gltA* 遺伝子及び CS のアミノ酸  
配列との相同性を調べた。結果を表 3 (塩基配列) 及び表 4 (アミノ酸配列) に  
示す。

## 【0060】

## 【表 3】

表3 各種gltA遺伝子の塩基配列の相同性

	ATCC13869	ATCC13032	AJ12310
ATCC13869	—	99.5%	85.7%
ATCC13032	—	—	85.6%
AJ12310	—	—	—

【0061】

【表4】

表4 各種CSのアミノ酸配列の相同性

	ATCC13869	ATCC13032	AJ12310
ATCC13869	—	99.3%	92.1%
ATCC13032	—	—	92.1%
AJ12310	—	—	—

【0062】

【発明の効果】

本発明により、コリネバクテリウム・グルタミカムのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼよりも反応至適温度及び熱安定性が高いグルタミン酸デヒドロゲナーゼ及びクエン酸シンターゼならびにそれらをコードする遺伝子が提供される。

【0063】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 高温耐性コリネ型細菌の耐熱性グルタミン酸生合成系酵素遺伝子

<130> P-6559

<140>

~~<141> 1999-10-04~~

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 6 4 】

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gdh gene

<400> 1

gcgcctgcag gtccgagggt gtgcgttcgg ca

32

【 0 0 6 5 】

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
amplifying gdh gene

<400> 2

gcgcctgcag ccaccagga tgccctcaacc ag

32

【 0 0 6 6 】

<210> 3

<211> 1344

<212> DNA

<213> *Corynebacterium thermoaminogenes*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1341)

<400> 3

atg act gta gat gag cag gtc tcc aac tac tac gac atg ctg ctg aag 48

Met Thr Val Asp Glu Gln Val Ser Asn Tyr Tyr Asp Met Leu Leu Lys

1

5

10

15

cgc aac gcc ggg gaa cct gag ttc cac cag gct gtc gcg gag gtt ctc 96

Arg Asn Ala Gly Glu Pro Glu Phe His Gln Ala Val Ala Glu Val Leu

20

25

30

gaa tct ctg aag atc gtc ctg gag aag gac ccg cac tac gcc gac tac 144

Glu Ser Leu Lys Ile Val Leu Glu Lys Asp Pro His Tyr Ala Asp Tyr

35

40

45

ggt ctg atc cag cgt ctc tgc gaa ccg gaa cgc cag ctg atc ttc cgt 192

Gly Leu Ile Gln Arg Leu Cys Glu Pro Glu Arg Gln Leu Ile Phe Arg

50	55	60	
gtg ccc tgg gtg gat gac aac ggt cag gtg cac gtc aac cgt ggt ttc			240
Val Pro Trp Val Asp Asp Asn Gly Gln Val His Val Asn Arg Gly Phe			
65	70	75	80
cgt gtc cag ttc aac tcc gca ctc ggc ccg tac aag ggt ggt ctg cgt			288
Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg			
85	90	95	
ttc cac ccc tcc gtc aac ctc ggc atc gtc aag ttc ctc ggc ttc gag			336
Phe His Pro Ser Val Asn Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Gly Phe Glu			
100	105	110	
cag atc ttc aag aac tcc ctc acc ggt ctg ccg atc ggt ggc ggc aag			384
Gln Ile Phe Lys Asn Ser Leu Thr Gly Leu Pro Ile Gly Gly Gly Lys			
115	120	125	
ggt ggt tcc gac ttc gac ccg aag ggc aag tcc gag ctg gag atc atg			432
Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Glu Leu Glu Ile Met			
130	135	140	
cgc ttc tgc cag tcc ttc atg acc gag ctg cac cgc cac atc ggc gag			480
Arg Phe Cys Gln Ser Phe Met Thr Glu Leu His Arg His Ile Gly Glu			
145	150	155	160
tac cgg gat gtc ccg gcc ggt gac atc gga gtc ggt ggc cgc gag atc			528
Tyr Arg Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Gly Gly Arg Glu Ile			
165	170	175	
ggt tac ctc ttc ggc cac tac cgc cgt ctg gcc aac cag cac gag tcc			576
Gly Tyr Leu Phe Gly His Tyr Arg Arg Leu Ala Asn Gln His Glu Ser			
180	185	190	
ggt gtg ctc acc ggc aag ggc ctg acc tgg ggt ggt tcc ctg gtc cgc			624
Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Leu Thr Trp Gly Gly Ser Leu Val Arg			
195	200	205	
acc gag gcc acc ggc ttc ggc acc gtc tac ttc gtc cag gag atg atc			672

Thr Glu Ala Thr Gly Phe Gly Thr Val Tyr Phe Val Gln Glu Met Ile  
 210 215 220  
 aag gcg gaa ggg gag acc ctc gag ggc aag aag gtc atc gtc tcc ggt 720  
 Lys Ala Glu Gly Glu Thr Leu Glu Gly Lys Lys Val Ile Val Ser Gly  
 225 230 235 240  
 tcc ggc aac gtg gcc acc tac gcc atc cag aag gtg cag gaa ctg ggt 768  
 Ser Gly Asn Val Ala Thr Tyr Ala Ile Gln Lys Val Gln Glu Leu Gly  
 245 250 255  
 gcg gtt gtg gtc ggc ttc tcc gac tcc agc ggc tgg gtc tcc acc ccg 816  
 Ala Val Val Val Gly Phe Ser Asp Ser Ser Gly Trp Val Ser Thr Pro  
 260 265 270  
 aac ggt gtt gac gtg gcc aag ctg cgt gag atc aag gag gtc cgt cgt 864  
 Asn Gly Val Asp Val Ala Lys Leu Arg Glu Ile Lys Glu Val Arg Arg  
 275 280 285  
 gca cgc gtg tcc tcc tac gcc gac gag gtg gag ggt gcg gag tac cac 912  
 Ala Arg Val Ser Ser Tyr Ala Asp Glu Val Glu Gly Ala Glu Tyr His  
 290 295 300  
 acc gac ggc tcc atc tgg gat ctg acc gcc gac atc gcg ctg ccc tgc 960  
 Thr Asp Gly Ser Ile Trp Asp Leu Thr Ala Asp Ile Ala Leu Pro Cys  
 305 310 315 320  
 gcc acc cag aac gaa ctg gac ggc gac aac gcc cgc acc ctc gcg gac 1008  
 Ala Thr Gln Asn Glu Leu Asp Gly Asp Asn Ala Arg Thr Leu Ala Asp  
 325 330 335  
 aac ggc tgc cgc ttc gtg gcg gag ggc gcc aac atg ccc tcc acc ccc 1056  
 Asn Gly Cys Arg Phe Val Ala Glu Gly Ala Asn Met Pro Ser Thr Pro  
 340 345 350  
 gag gcc atc gac gtc ttc cgt gag cgt ggt gtt ctc ttc ggg ccg ggc 1104  
 Glu Ala Ile Asp Val Phe Arg Glu Arg Gly Val Leu Phe Gly Pro Gly  
 355 360 365

aag gct gcc aac gcc ggt ggc gtg gcc acc tcc gcc ctg gag atg cag 1152  
 Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Thr Ser Ala Leu Glu Met Gln  
 370 375 380  
 cag aac gcc tcc cgt gat tcc tgg agc ttc gag tac acc gat gag cgt 1200  
 Gln Asn Ala Ser Arg Asp Ser Trp Ser Phe Glu Tyr Thr Asp Glu Arg  
 385 390 395 400  
 ctc cac cgc atc atg aag aac atc ttc aag tcc tgc gcc gat acc gcc 1248  
 Leu His Arg Ile Met Lys Asn Ile Phe Lys Ser Cys Ala Asp Thr Ala  
 405 410 415  
 aag gag tac ggc cac gag aag aac tac gtg gtc ggt gcg aac atc gcc 1296  
 Lys Glu Tyr Gly His Glu Lys Asn Tyr Val Val Gly Ala Asn Ile Ala  
 420 425 430  
 gga ttc aag aag gtc gct gac gcc atg ctc gcc cag ggt gtc atc taa 1344  
 Gly Phe Lys Lys Val Ala Asp Ala Met Leu Ala Gln Gly Val Ile  
 435 440 445

[0 0 6 7]

<210> 4

<211> 447

<212> PRT

<213> *Corynebacterium thermoaminogenes*

<400> 4

Met Thr Val Asp Glu Gln Val Ser Asn Tyr Tyr Asp Met Leu Leu Lys

1 5 10 15

Arg Asn Ala Gly Glu Pro Glu Phe His Gln Ala Val Ala Glu Val Leu

20 25 30

Glu Ser Leu Lys Ile Val Leu Glu Lys Asp Pro His Tyr Ala Asp Tyr

35 40 45

Gly Leu Ile Gln Arg L u Cys Glu Pro Glu Arg Gln Leu Ile Phe Arg

50	55	60
Val Pro Trp Val Asp Asp Asn Gly Gln Val His Val Asn Arg Gly Phe		
65	70	75
Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg		
	85	90
Phe His Pro Ser Val Asn Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Gly Phe Glu		
100	105	110
Gln Ile Phe Lys Asn Ser Leu Thr Gly Leu Pro Ile Gly Gly Gly Lys		
115	120	125
Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Glu Leu Glu Ile Met		
130	135	140
Arg Phe Cys Gln Ser Phe Met Thr Glu Leu His Arg His Ile Gly Glu		
145	150	155
Tyr Arg Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Gly Gly Arg Glu Ile		
	165	170
Gly Tyr Leu Phe Gly His Tyr Arg Arg Leu Ala Asn Gln His Glu Ser		
180	185	190
Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Leu Thr Trp Gly Gly Ser Leu Val Arg		
195	200	205
Thr Glu Ala Thr Gly Phe Gly Thr Val Tyr Phe Val Gln Glu Met Ile		
210	215	220
Lys Ala Glu Gly Glu Thr Leu Glu Gly Lys Lys Val Ile Val Ser Gly		
225	230	235
Ser Gly Asn Val Ala Thr Tyr Ala Ile Gln Lys Val Gln Glu Leu Gly		
	245	250
Ala Val Val Val Gly Phe Ser Asp Ser Ser Gly Trp Val Ser Thr Pro		
260	265	270
Asn Gly Val Asp Val Ala Lys L u Arg Glu Ile Lys Glu Val Arg Arg		
275	280	285

Ala Arg Val Ser Ser Tyr Ala Asp Glu Val Glu Gly Ala Glu Tyr His

290

295

300

Thr Asp Gly Ser Ile Trp Asp Leu Thr Ala Asp Ile Ala Leu Pro Cys

305

310

315

320

Ala Thr Gln Asn Glu Leu Asp Gly Asp Asn Ala Arg Thr Leu Ala Asp

325

330

335

Asn Gly Cys Arg Phe Val Ala Glu Gly Ala Asn Met Pro Ser Thr Pro

340

345

350

Glu Ala Ile Asp Val Phe Arg Glu Arg Gly Val Leu Phe Gly Pro Gly

355

360

365

Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Thr Ser Ala Leu Glu Met Gln

370

375

380

Gln Asn Ala Ser Arg Asp Ser Trp Ser Phe Glu Tyr Thr Asp Glu Arg

385

390

395

400

Leu His Arg Ile Met Lys Asn Ile Phe Lys Ser Cys Ala Asp Thr Ala

405

410

415

Lys Glu Tyr Gly His Glu Lys Asn Tyr Val Val Gly Ala Asn Ile Ala

420

425

430

Gly Phe Lys Lys Val Ala Asp Ala Met Leu Ala Gln Gly Val Ile

435

440

445

[0 0 6 8]

<210> 5

<211> 1344

<212> DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1341)

<400> 5

atg aca gtt gat gag cag gtc tct aac tat tac gac atg ctt ctg aag	48
Met Thr Val Asp Glu Gln Val Ser Asn Tyr Tyr Asp Met Leu Leu Lys	
1 5 10 15	
cgc aat gct ggc gag cct gaa ttt cac cag gca gtg gca gag gtt ttg	96
Arg Asn Ala Gly Glu Pro Glu Phe His Gln Ala Val Ala Glu Val Leu	
20 25 30	
gaa tct ttg aag atc gtc ctg gaa aag gac cct cat tac gct gat tac	144
Glu Ser Leu Lys Ile Val Leu Glu Lys Asp Pro His Tyr Ala Asp Tyr	
35 40 45	
ggc ctc atc cag cgc ctg tgc gag cct gag cgt cag ctc atc ttc cgt	192
Gly Leu Ile Gln Arg Leu Cys Glu Pro Glu Arg Gln Leu Ile Phe Arg	
50 55 60	
gtg cct tgg gtt gat gac cag ggc cag gtc cac gtc aac cgt ggt ttc	240
Val Pro Trp Val Asp Asp Gln Gly Gln Val His Val Asn Arg Gly Phe	
65 70 75 80	
cgc gtg cag ttc aac tct gca ctt gga cca tac aag ggc ggc ctg cgc	288
Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg	
85 90 95	
ttc cac cca tct gta aac ctg ggc att gtg aag ttc ctg ggc ttt gag	336
Phe His Pro Ser Val Asn Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Gly Phe Glu	
100 105 110	
cag atc ttt aaa aac tcc cta acc ggc ctg cca atc ggt ggt ggc aag	384
Gln Ile Phe Lys Asn Ser Leu Thr Gly Leu Pro Ile Gly Gly Gly Lys	
115 120 125	
ggc gga tcc gac ttc gac cct aag ggc aag tcc gat ctg gaa atc atg	432
Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Asp Leu Glu Ile Met	
130 135 140	

cgt ttc tgc cag tcc ttc atg acc gag ctg cac cgc cac atc ggt gag	480
Arg Phe Cys Gln Ser Phe Met Thr Glu Leu His Arg His Ile Gly Glu	
145                      150                      155                      160	
tac cgc gac gtt cct gca ggt gac atc gga gtt ggt ggc cgc gag atc	528
Tyr Arg Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Gly Gly Arg Glu Ile	
165                      170                      175	
ggt tac ctg ttt ggc cac tac cgt cgc atg gct aac cag cac gag tcc	576
Gly Tyr Leu Phe Gly His Tyr Arg Arg Met Ala Asn Gln His Glu Ser	
180                      185                      190	
ggc gtt ttg acc ggt aag ggc ctg acc tgg ggt gga tcc ctg gtc cgc	624
Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Leu Thr Trp Gly Gly Ser Leu Val Arg	
195                      200                      205	
acc gag gca act ggc tac ggc tgc gtt tac ttc gtg agt gaa atg atc	672
Thr Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Cys Val Tyr Phe Val Ser Glu Met Ile	
210                      215                      220	
aag gct aag ggc gag agc atc agc ggc cag aag atc atc gtt tcc ggt	720
Lys Ala Lys Gly Glu Ser Ile Ser Gly Gln Lys Ile Ile Val Ser Gly	
225                      230                      235                      240	
tcc ggc aac gta gca acc tac gcg att gaa aag gct cag gaa ctc ggc	768
Ser Gly Asn Val Ala Thr Tyr Ala Ile Glu Lys Ala Gln Glu Leu Gly	
245                      250                      255	
gca acc gtt att ggt ttc tcc gat tcc agc ggt tgg gtt cat acc cct	816
Ala Thr Val Ile Gly Phe Ser Asp Ser Ser Gly Trp Val His Thr Pro	
260                      265                      270	
aac ggc gtt gac gtg gct aag ctc cgc gaa atc aag gaa gtt cgc cgc	864
Asn Gly Val Asp Val Ala Lys Leu Arg Glu Ile Lys Glu Val Arg Arg	
275                      280                      285	
gca cgc gta tcc gtg tac gcc gac gaa att gaa ggc gca acc tac cac	912
Ala Arg Val Ser Val Tyr Ala Asp Glu Ile Glu Gly Ala Thr Tyr His	



290	295	300	
acc gac ggt tcc atc tgg gat ctc aag tgc gat atc gct ctt cct tgt			960
Thr Asp Gly Ser Ile Trp Asp Leu Lys Cys Asp Ile Ala Leu Pro Cys			
305	310	315	320
gca act cag aac gag ctc aac ggc gag aac gct aag act ctt gca gac			1008
Ala Thr Gln Asn Glu Leu Asn Gly Glu Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp			
325	330	335	
aac ggc tgc cgt ttc gtt gct gaa ggc gcg aac atg cct tcc acc cct			1056
Asn Gly Cys Arg Phe Val Ala Glu Gly Ala Asn Met Pro Ser Thr Pro			
340	345	350	
gag gct gtt gag gtc ttc cgt gag cgc gac atc cgc ttc gga cca ggc			1104
Glu Ala Val Glu Val Phe Arg Glu Arg Asp Ile Arg Phe Gly Pro Gly			
355	360	365	
aag gca gct aac gct ggt ggc gtt gca acc tcc gct ctg gag atg cag			1152
Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Thr Ser Ala Leu Glu Met Gln			
370	375	380	
cag aac gct tcg cgc gat tcc tgg agc ttc gag tac acc gac gag cgc			1200
Gln Asn Ala Ser Arg Asp Ser Trp Ser Phe Glu Tyr Thr Asp Glu Arg			
385	390	395	400
ctc cag gtg atc atg aag aac atc ttc aag acc tgt gca gag acc gca			1248
Leu Gln Val Ile Met Lys Asn Ile Phe Lys Thr Cys Ala Glu Thr Ala			
405	410	415	
gca gag tat gga cac gag aac gat tac gtt gtc ggc gct aac att gct			1296
Ala Glu Tyr Gly His Glu Asn Asp Tyr Val Val Gly Ala Asn Ile Ala			
420	425	430	
ggc ttt aag aag gta gct gac gcg atg ctg gca cag ggc gtc atc taa			1344
Gly Phe Lys Lys Val Ala Asp Ala Met Leu Ala Gln Gly Val Ile			
435	440	445	

【0069】

<210> 6

<211> 447

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 6

Met Thr Val Asp Glu Gln Val Ser Asn Tyr Tyr Asp Met Leu Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Arg Asn Ala Gly Glu Pro Glu Phe His Gln Ala Val Ala Glu Val Leu  
 20 25 30  
 Glu Ser Leu Lys Ile Val Leu Glu Lys Asp Pro His Tyr Ala Asp Tyr  
 35 40 45  
 Gly Leu Ile Gln Arg Leu Cys Glu Pro Glu Arg Gln Leu Ile Phe Arg  
 50 55 60  
 Val Pro Trp Val Asp Asp Gln Gly Gln Val His Val Asn Arg Gly Phe  
 65 70 75 80  
 Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg  
 85 90 95  
 Phe His Pro Ser Val Asn Leu Gly Ile Val Lys Phe Leu Gly Phe Glu  
 100 105 110  
 Gln Ile Phe Lys Asn Ser Leu Thr Gly Leu Pro Ile Gly Gly Gly Lys  
 115 120 125  
 Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Asp Leu Glu Ile Met  
 130 135 140  
 Arg Phe Cys Gln Ser Phe Met Thr Glu Leu His Arg His Ile Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Tyr Arg Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Gly Gly Arg Glu Ile  
 165 170 175  
 Gly Tyr Leu Phe Gly His Tyr Arg Arg Met Ala Asn Gln His Glu Ser

180	185	190
Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Leu Thr Trp Gly Gly Ser Leu Val Arg		
195	200	205
Thr Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Cys Val Tyr Phe Val Ser Glu Met Ile		
210	215	220
<del>Lys Ala Lys Gly Glu Ser Ile Ser Gly Gln Lys Ile Ile Val Ser Gly</del>		
225	230	235
Ser Gly Asn Val Ala Thr Tyr Ala Ile Glu Lys Ala Gln Glu Leu Gly		240
245	250	255
Ala Thr Val Ile Gly Phe Ser Asp Ser Ser Gly Trp Val His Thr Pro		
260	265	270
Asn Gly Val Asp Val Ala Lys Leu Arg Glu Ile Lys Glu Val Arg Arg		
275	280	285
Ala Arg Val Ser Val Tyr Ala Asp Glu Ile Glu Gly Ala Thr Tyr His		
290	295	300
Thr Asp Gly Ser Ile Trp Asp Leu Lys Cys Asp Ile Ala Leu Pro Cys		
305	310	315
Ala Thr Gln Asn Glu Leu Asn Gly Glu Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp		
325	330	335
Asn Gly Cys Arg Phe Val Ala Glu Gly Ala Asn Met Pro Ser Thr Pro		
340	345	350
Glu Ala Val Glu Val Phe Arg Glu Arg Asp Ile Arg Phe Gly Pro Gly		
355	360	365
Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Thr Ser Ala Leu Glu Met Gln		
370	375	380
Gln Asn Ala Ser Arg Asp Ser Trp Ser Phe Glu Tyr Thr Asp Glu Arg		
385	390	395
Leu Gln Val Ile Met Lys Asn Ile Phe Lys Thr Cys Ala Glu Thr Ala		
405	410	415

Ala Glu Tyr Gly His Glu Asn Asp Tyr Val Val Gly Ala Asn Ile Ala

420

425

430

Gly Phe Lys Lys Val Ala Asp Ala Met Leu Ala Gln Gly Val Ile

435

440

445

【 0 0 7 0 】

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gltA gene

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)

<223> n=inosine

<400> 7

aagatcacnt acatcgaygg

20

【 0 0 7 1 】

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gltA gene

<400> 8

tagaagtcta cgttcgggta

20

[ 0 0 7 2 ]

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gltA gene

<400> 9

gtcgacaata gcctgaatct g

21

[ 0 0 7 3 ]

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gltA gene

<400> 10

cggtggaacc ggtgctgaca t

21

[ 0 0 7 4 ]

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gltA gene

<400> 11

gggtgggga attcggtcatg t

21

[ 0 0 7 5 ]

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
amplifying gltA gene

<400> 12

tgtcgtagcc gcggtagcgc a

21

【 0 0 7 6 】

<210> 13

<211> 1293

<212> DNA

<213> *Corynebacterium thermoaminogenes*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1290)

【 0 0 7 7 】

<400> 13

```

gtg gct tct gat aac aac aag gct gta ctg cac tac cct ggc ggc gaa 48
Val Ala Ser Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu
      1             5             10            15
ttc gag atg ggc atc aag cag gcc acc gag ggt aac tcc ggt gtc atc 96
Phe Glu Met Gly Ile Lys Gln Ala Thr Glu Gly Asn Ser Gly Val Ile
            20            25            30
ctg ggt aag atg ctg tcg gaa acc ggt ctg gtc acc ttc gac ccc ggt 144
Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Val Thr Phe Asp Pro Gly
            35            40            45
tat gtc agc acc ggt tcc acc gaa tcc aag atc acc tac atc gat ggt 192
Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly
            50            55            60
gat gca ggc atc ctg cgc tac cgc ggc tac gac att gcg gat ctg gcc 240
Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala
            65            70            75            80
gaa aat gcc acc ttc aat gag gtc tcc tac ctc ctg atc aag ggt gag 288
Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu Ile Lys Gly Glu

```

85	90	95	
ctc ccg acc ccg gaa gag ctc cac aag ttc aac gac gag att cgt cac			336
Leu Pro Thr Pro Glu Glu Leu His Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His			
100	105	110	
cac acc ctg ctg gac gag gac ttc aag tcc cag ttc aat gtc ttc cct			384
His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pro			
115	120	125	
cgc gat gcc cac ccg atg gcc acc ctg gcc tcc tcg gtt aac atc ctc			432
Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu			
130	135	140	
tcc acc tac tac cag gat cag ctg gat ccc ctg gat gag gct cag ctg			480
Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asp Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu			
145-----	150	155	160
gac aag gca acc gtc cgc ctg atg gcg aag gtt ccg atg ctg gct gca			528
Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro Met Leu Ala Ala			
165	170	175	
tac gca cac cgt gcc cgc aag ggt gcg ccg tac atg tac ccg gac aac			576
Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met Tyr Pro Asp Asn			
180	185	190	
tcc ctc aat gcc cgt gag aac ttc ctg cgc atg atg ttc ggt tac ccg			624
Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met Phe Gly Tyr Pro			
195	200	205	
acc gag ccg tac gag gtt gat ccg atc atg gtc aaa gcc ctc gac aag			672
Thr Glu Pro Tyr Glu Val Asp Pro Ile Met Val Lys Ala Leu Asp Lys			
210	215	220	
ctg ctc atc ctg cac gca gac cac gag cag aac tgc tcc acc tcc act			720
Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys Ser Thr Ser Thr			
225	230	235	240
gtc cgc atg atc ggc tcc gcg cag gcg aac atg ttc gtc tcc atc gcc			768



Val Arg Met Il	Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe Val Ser Ile Ala	
245	250	255
ggc ggc atc aac gca ctc tcc ggc ccg ctg cac ggt ggc gcc aac cag	816	
Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly Gly Ala Asn Gln		
260	265	270
gct gtc ctc gag atg ctc gag gag atc gca gcc aac ggc ggc gac gca	864	
Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Glu Ile Ala Ala Asn Gly Gly Asp Ala		
275	280	285
acc gac ttc atg aac cgc gtg aag aac aag gag aag ggt gtc cgc ctc	912	
Thr Asp Phe Met Asn Arg Val Lys Asn Lys Glu Lys Gly Val Arg Leu		
290	295	300
atg ggc ttc gga cac cgc gtc tac aag aac tac gat ccg cgt gca gcc	960	
Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala		
305	310	315
atc gtc aag gac acc gcc cac gag atc ctc gag cac ctc ggt ggc gac	1008	
Ile Val Lys Asp Thr Ala His Glu Ile Leu Glu His Leu Gly Gly Asp		
325	330	335
cca ctg ctg gat ctg gct ctc aag ctg gaa gaa atc gca ctc aac gac	1056	
Pro Leu Leu Asp Leu Ala Leu Lys Leu Glu Glu Ile Ala Leu Asn Asp		
340	345	350
gat tac ttc atc tcc cgc aag ctg tac ccg aac gtg gac ttc tac acc	1104	
Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr		
355	360	365
ggc ctg atc tac cgc gcc atg ggc ttc ccg acg gac ttc ttc acc gtc	1152	
Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val		
370	375	380
ctg ttc gcc atc ggc cgc ctc ccg ggc tgg atc gcc cac tac cgc gag	1200	
Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu		
385	390	395
		400

cag ctc gcc gat ccg ggc gcc aag atc aac cgt cct cgc cag atc tac 1248

Gln Leu Ala Asp Pro Gly Ala Lys Il Asn Arg Pr Arg Gln Ile Tyr

405

410

415

acc ggt gag acc gca cgc aag atc atc ccc cgc gaa gag cgc tag 1293

Thr Gly Glu Thr Ala Arg Lys Ile Ile Pro Arg Glu Glu Arg

420

425

430

【0 0 7 8】

<210> 14

<211> 430

<212> PRT

<213> *Corynebacterium thermoaminogenes*

<400> 14

Val Ala Ser Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu His Tyr Pro Gly Gly Glu

1

5

10

15

Phe Glu Met Gly Ile Lys Gln Ala Thr Glu Gly Asn Ser Gly Val Ile

20

25

30

Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu Val Thr Phe Asp Pro Gly

35

40

45

Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys Ile Thr Tyr Ile Asp Gly

50

55

60

Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr Asp Ile Ala Asp Leu Ala

65

70

75

80

Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr Leu Leu Ile Lys Gly Glu

85

90

95

Leu Pr Thr Pr Glu Glu Leu His Lys Phe Asn Asp Glu Ile Arg His

100

105

110

His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser Gln Phe Asn Val Phe Pr

115

120

125

Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala Ser Ser Val Asn Ile Leu  
 130 135 140  
 Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asp Pro Leu Asp Glu Ala Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys Val Pro Met Leu Ala Ala  
 165 170 175  
 Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro Tyr Met Tyr Pro Asp Asn  
 180 185 190  
 Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg Met Met Phe Gly Tyr Pro  
 195 200 205  
 Thr Glu Pro Tyr Glu Val Asp Pro Ile Met Val Lys Ala Leu Asp Lys  
 210 215 220  
 Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln Asn Cys Ser Thr Ser Thr  
 225 230 235 240  
 Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn Met Phe Val Ser Ile Ala  
 245 250 255  
 Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu His Gly Gly Ala Asn Gln  
 260 265 270  
 Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Glu Ile Ala Ala Asn Gly Gly Asp Ala  
 275 280 285  
 Thr Asp Phe Met Asn Arg Val Lys Asn Lys Glu Lys Gly Val Arg Leu  
 290 295 300  
 Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Val Lys Asp Thr Ala His Glu Ile Leu Glu His Leu Gly Gly Asp  
 325 330 335  
 Pr Leu Leu Asp Leu Ala Leu Lys Leu Glu Glu Ile Ala Leu Asn Asp  
 340 345 350  
 Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr

355 360 365  
 Gly Leu Ile Tyr Arg Ala M t Gly Phe Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val  
 370 375 380  
 Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu  
 385 390 395 400  
 Gln Leu Ala Asp Pro Gly Ala Lys Ile Asn Arg Pro Arg Gln Ile Tyr  
 405 410 415  
 Thr Gly Glu Thr Ala Arg Lys Ile Ile Pro Arg Glu Glu Arg  
 420 425 430

【0 0 7 9】

<210> 15

<211> 1314

<212> DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1311)

<400> 15

atg ttt gaa agg gat atc gtg gct act gat aac aac aag gct gtc ctg 48  
 Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu  
 1 5 10 15  
 cac tac ccc ggt ggc gag ttc gaa atg gac atc atc gag gct tct gag 96  
 His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu  
 20 25 30  
 ggt aac aac ggt gtt gtc ctg ggc aag atg ctg tct gag act gga ctg 144  
 Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu  
 35 40 45

atc act ttt gac cca ggt tat gtg agc act ggc tcc acc gag tcg aag 192  
Ile Thr Phe Asp Pro Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu S r Lys

50

55

60

atc acc tac atc gat ggc gat gcg gga atc ctg cgt tac cgc ggc tat 240  
Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr

65

70

75

80

gac atc gct gat ctg gct gag aat gcc acc ttc aac gag gtt tct tac 288  
Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr

85

90

95

cta ctt atc aac ggt gaa cta cca acc cca gat gag ctt cac aag ttt 336  
Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe

100

105

110

aac gac-gag att cgc cac cac acc ctt-ctg gac-gag gac ttc aag tcc 384  
Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser

115

120

125

cag ttc aac gtg ttc cca cgc gac gct cac cca atg gca acc ttg gct 432  
Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala

130

135

140

tcc tcg gtt aac att ttg tct acc tac tac cag gat cag ctg aac cca 480  
Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro

145

150

155

160

ctc gat gag gca cag ctt gat aag gca acc gtt cgc-ctc atg gca aag 528  
Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys

165

170

175

gtt cca atg ctg gct gcg tac gca cac cgc gca cgc aag ggt gct cct 576  
Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro

180

185

190

tac atg tac cca gac aac tcc ctc aac gcg cgt gag aac ttc ctg cgc 624  
Tyr Met Tyr Pr Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg

195	200	205	
atg atg ttc ggt tac cca acc gag cca tac gag atc gac cca atc atg			672
Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met			
210	215	220	
gtc aag gct ctg gac aag ctg ctc atc ctg cac gct gac cac gag cag			720
Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln			
225	230	235	240
aac tgc tcc acc tcc acc gtt cgt atg atc ggt tcc gca cag gcc aac			768
Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn			
245	250	255	
atg ttt gtc tcc atc gct ggt ggc atc aac gct ctg tcc ggc cca ctg			816
Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu			
260	265	270	
cac ggt ggc gca aac cag gct gtt ctg gag atg ctc gaa gac atc aag			864
His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys			
275	280	285	
aac aac cac ggt ggc gac gca acc gcg ttc atg aac aag gtc aag aac			912
Asn Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Ala Phe Met Asn Lys Val Lys Asn			
290	295	300	
aag gaa gac ggc gtc cgc ctc atg ggc ttc gga cac cgc gtt tac aag			960
Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys			
305	310	315	320
aac tac gat cca cgt gca gca atc gtc aag gag acc gca cac gag atc			1008
Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile			
325	330	335	
ctc gag cac ctc ggt ggc gac gat ctt ctg gat ctg gca atc aag ctg			1056
Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu			
340	345	350	
gaa gaa att gca ctg gct gat gat tac ttc atc tcc cgc aag ctc tac			1104

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Ph Ile Ser Arg Lys Leu Tyr  
 355 360 365  
 ccg aac gta gac ttc tac acc ggc ctg atc tac cgc gca atg ggc ttc 1152  
 Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe  
 370 375 380  
 cca act gac ttc ttc acc gta ttg ttc gca atc ggt cgt ctg cca gga 1200  
 Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly  
 385 390 395 400  
 tgg atc gct cac tac cgc gag cag ctc ggt gca gca ggc aac aag atc 1248  
 Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile  
 405 410 415  
 aac cgc cca cgc cag gtc tac acc ggc aag gaa tcc cgc aag ttg gtt 1296  
 Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Lys Leu Val  
 420 425 430  
 cct cgc gag gag cgc taa 1314  
 Pro Arg Glu Glu Arg

435

[0 0 8 0]

<210> 16

<211> 437

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 16

Met Phe Glu Arg Asp Ile Val Ala Thr Asp Asn Asn Lys Ala Val Leu  
 1 5 10 15  
 His Tyr Pro Gly Gly Glu Phe Glu Met Asp Ile Ile Glu Ala Ser Glu  
 20 25 30  
 Gly Asn Asn Gly Val Val Leu Gly Lys Met Leu Ser Glu Thr Gly Leu

特平 1 1 - 2 8 2 7 1

35	40	45
Ile Thr Phe Asp Pr	Gly Tyr Val Ser Thr Gly Ser Thr Glu Ser Lys	
50	55	60
Ile Thr Tyr Ile Asp Gly Asp Ala Gly Ile Leu Arg Tyr Arg Gly Tyr		
65	70	75
Asp Ile Ala Asp Leu Ala Glu Asn Ala Thr Phe Asn Glu Val Ser Tyr		
85	90	95
Leu Leu Ile Asn Gly Glu Leu Pro Thr Pro Asp Glu Leu His Lys Phe		
100	105	110
Asn Asp Glu Ile Arg His His Thr Leu Leu Asp Glu Asp Phe Lys Ser		
115	120	125
Gln Phe Asn Val Phe Pro Arg Asp Ala His Pro Met Ala Thr Leu Ala		
130	135	140
Ser Ser Val Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Tyr Gln Asp Gln Leu Asn Pro		
145	150	155
Leu Asp Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ala Thr Val Arg Leu Met Ala Lys		
165	170	175
Val Pro Met Leu Ala Ala Tyr Ala His Arg Ala Arg Lys Gly Ala Pro		
180	185	190
Tyr Met Tyr Pro Asp Asn Ser Leu Asn Ala Arg Glu Asn Phe Leu Arg		
195	200	205
Met Met Phe Gly Tyr Pro Thr Glu Pro Tyr Glu Ile Asp Pro Ile Met		
210	215	220
Val Lys Ala Leu Asp Lys Leu-Leu Ile Leu His Ala Asp His Glu Gln		
225	230	235
Asn Cys Ser Thr Ser Thr Val Arg Met Ile Gly Ser Ala Gln Ala Asn		
245	250	255
Met Phe Val Ser Ile Ala Gly Gly Ile Asn Ala Leu Ser Gly Pro Leu		
260	265	270



His Gly Gly Ala Asn Gln Ala Val Leu Glu Met Leu Glu Asp Ile Lys

275

280

285

Asn Asn His Gly Gly Asp Ala Thr Ala Phe Met Asn Lys Val Lys Asn

290

295

300

Lys Glu Asp Gly Val Arg Leu Met Gly Phe Gly His Arg Val Tyr Lys

305

310

315

320

Asn Tyr Asp Pro Arg Ala Ala Ile Val Lys Glu Thr Ala His Glu Ile

325

330

335

Leu Glu His Leu Gly Gly Asp Asp Leu Leu Asp Leu Ala Ile Lys Leu

340

345

350

Glu Glu Ile Ala Leu Ala Asp Asp Tyr Phe Ile Ser Arg Lys Leu Tyr

355

360

365

Pro Asn Val Asp Phe Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Arg Ala Met Gly Phe

370

375

380

Pro Thr Asp Phe Phe Thr Val Leu Phe Ala Ile Gly Arg Leu Pro Gly

385

390

395

400

Trp Ile Ala His Tyr Arg Glu Gln Leu Gly Ala Ala Gly Asn Lys Ile

405

410

415

Asn Arg Pro Arg Gln Val Tyr Thr Gly Lys Glu Ser Arg Lys Leu Val

420

425

430

Pro Arg Glu Glu Arg

435

# 【図面の簡単な説明】

【図1】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム2256株のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの活性の温度による変化を示す図。

【図2】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム2256株のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの

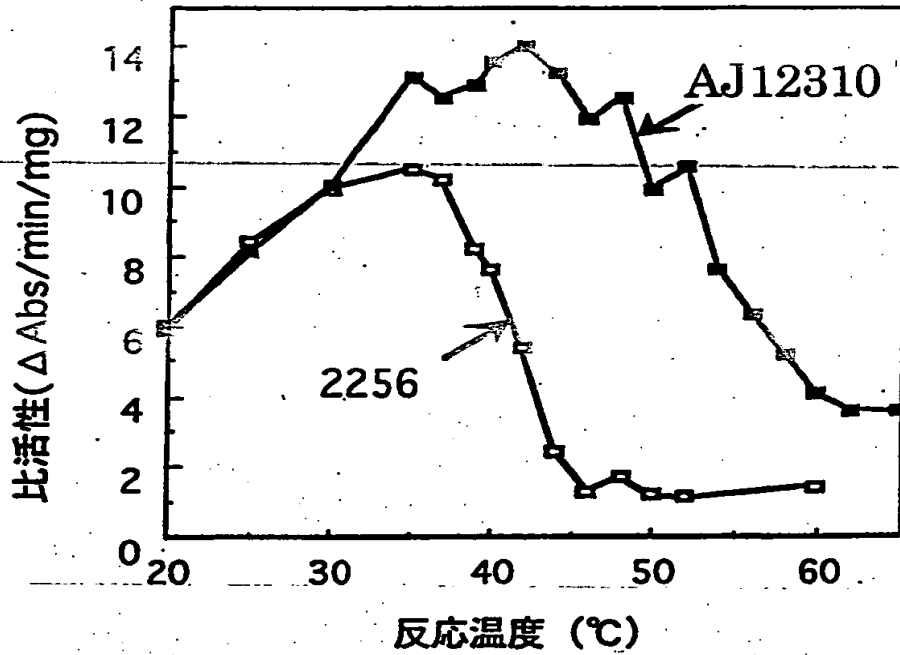
熱安定性を示す図。

【図 3】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム2256株のクエン酸シンターゼの活性の温度による変化を示す図。

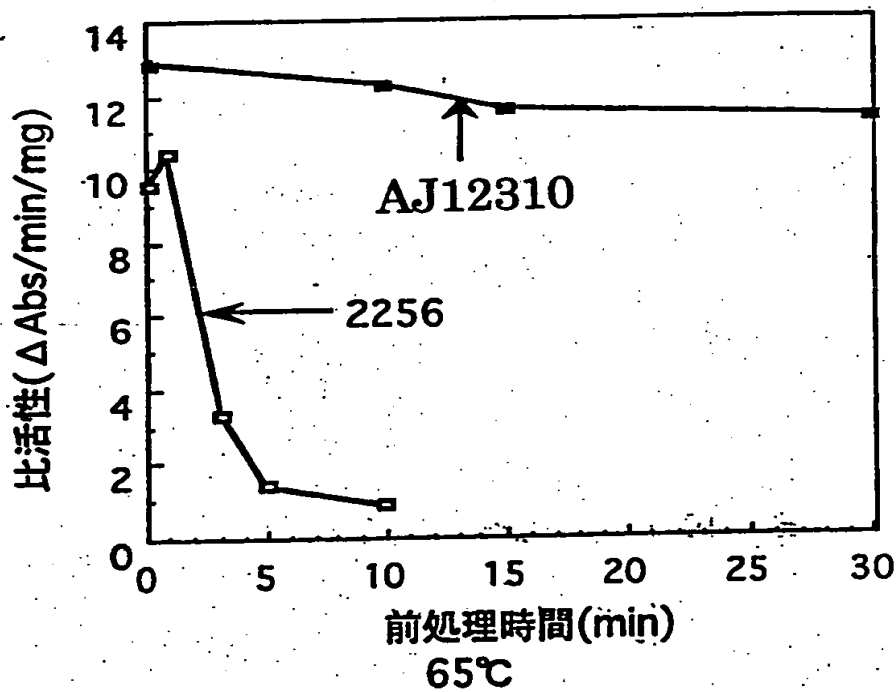
【図 4】 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスAJ12310株及びブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム2256株のクエン酸シンターゼの熱安定性を示す図。

【書類名】 図面

【図 1】

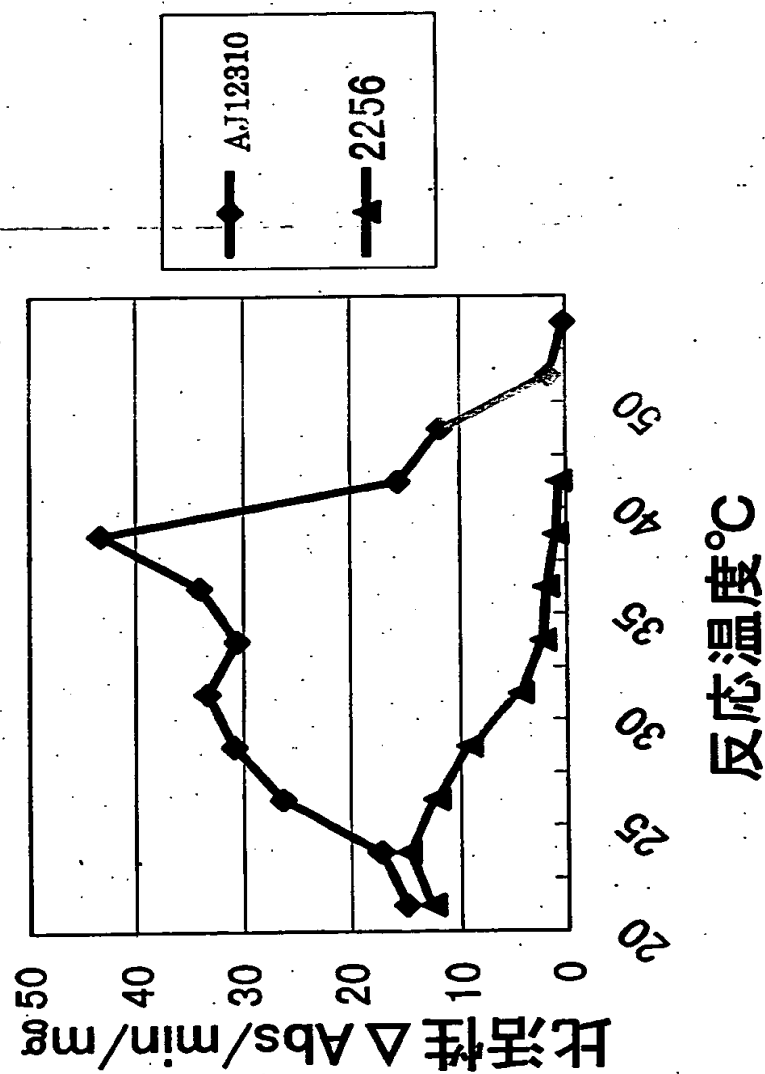


【図 2】

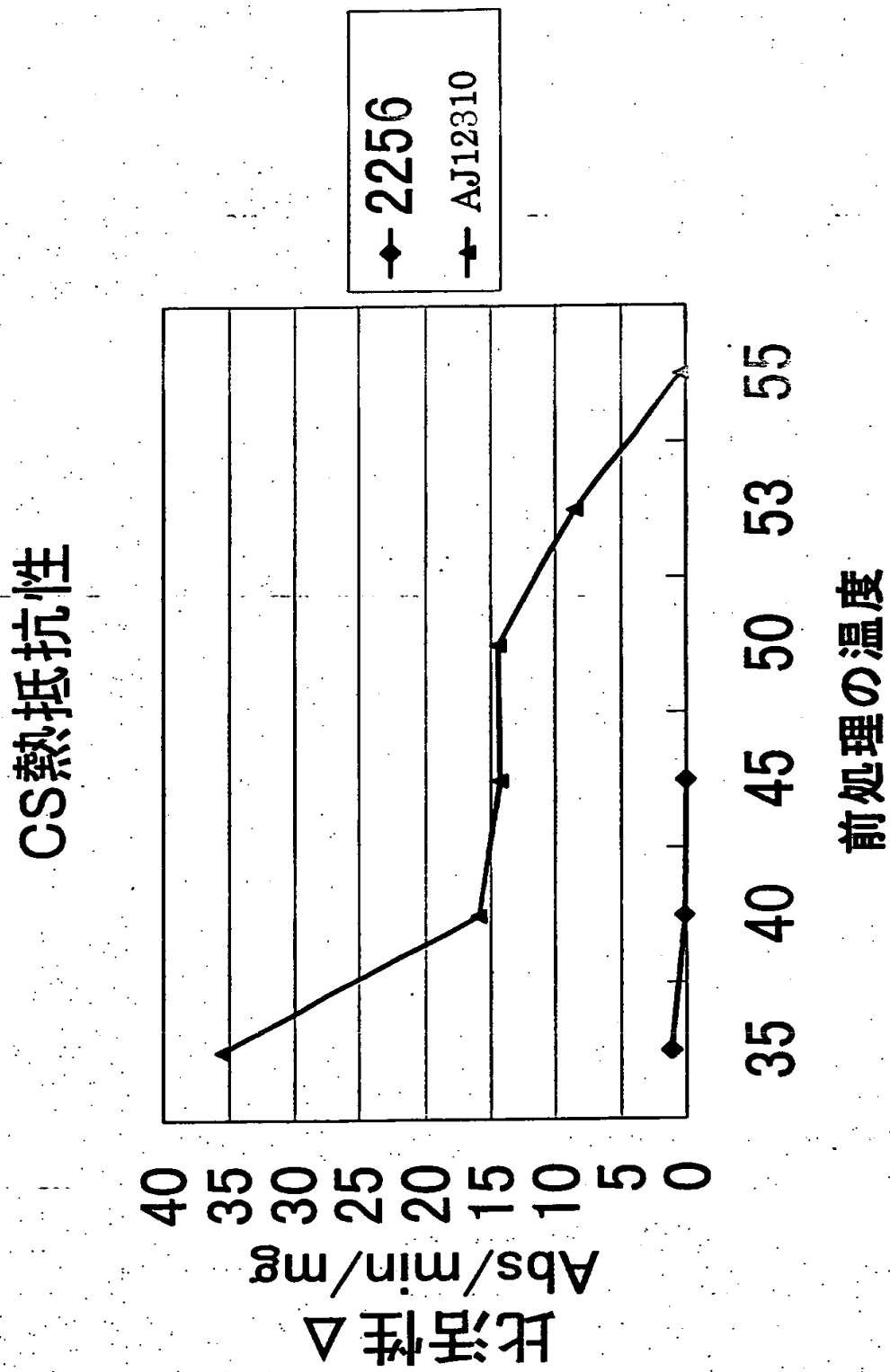


【図 3】

CS活性



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネバクテリウム・グルタミカムよりも高い温度で機能するコリネバクテリウム・サーモアミノゲネス由来の酵素及びそれらをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】- すでに報告されている種々の微生物のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子又はクエン酸シンターゼ遺伝子の塩基配列の比較を行い、塩基配列がよく保存されている領域を見出し、その領域の塩基配列の基づいて設計したプライマーを用いて、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネスの染色体DNAから、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子又はクエン酸シンターゼ遺伝子の部分断片を取得し、これらを用いてゲノムウォーキングを行うことにより、前記遺伝子全体を取得する。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---